



1645
#7
mg
01/09/02

35.C15717

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)	
NOBUKO YAMAMOTO ET AL.)	Examiner: Not Yet Assigned
Application No.: 09/942,588)	Group Art Unit: 1645
Filed: August 31, 2001)	
For: SCREENING METHOD FOR)	
GENE VARIATION)	November 15, 2001

RECEIVED
NOV 21 2001
TECH CENTER 1600/2900

RECEIVED

DEC 07 2001

TECH CENTER 1600/2900

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

CLAIM TO PRIORITY

Sir:


Applicants hereby claim priority under the International Convention and all rights to which they are entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following Japanese Priority Application:

2000-263396, filed August 31, 2000

A certified copy of the priority document is enclosed.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,



Attorney for Applicants

Registration No. 48,512

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

NY_MAIN 217425 v 1

CFO 15717 US/shi

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application: 2000年 8月31日

出願番号
Application Number: 特願2000-263396

出願人
Applicant(s): キヤノン株式会社

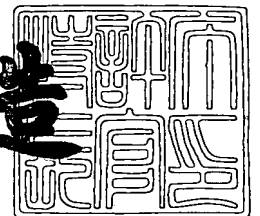
RECEIVED
NOV 21 2001
TECH CENTER 1600/2900

RECEIVED
DEC 07 2001
TECH CENTER 1600/2900

2001年 9月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3083538

1

【書類名】 特許願
【整理番号】 3912042
【提出日】 平成12年 8月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12Q 1/68
【発明の名称】 変異遺伝子のスクリーニング方法
【請求項の数】 21
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内
【氏名】 山本 伸子
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内
【氏名】 岡本 尚志
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内
【氏名】 鈴木 智博
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内
【氏名】 田中 信也
【特許出願人】
【識別番号】 000001007
【氏名又は名称】 キヤノン株式会社
【代理人】
【識別番号】 100088328
【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異遺伝子のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検体核酸中における変異を監視するための変異判定方法であって、

検体核酸の被部検出部に対し完全に相補的である完全対合プローブと、該被検出部に対して不対合な塩基を少なくともひとつ備える複数種の不対合プローブとを含む複数種のプローブを、基板上の所定の複数の区分領域中に分配配置して固定した DNA アレイ基板を用意する工程と、

該 DNA アレイ基板上のプローブに対して検体核酸を反応させる工程と、

前記プローブのいずれかと前記検体核酸とのハイブリッド体の形成に基づくシグナルを、前記複数の区分領域ごとの全シグナルとして測定する工程と、

前記複数の区分領域ごとの全シグナルの変化のパターンから前記検体の核酸中の変異を判定する工程

とを有することを特徴とする変異判定のための方法。

【請求項 2】 前記区分領域毎の全シグナルが、前記ハイブリッド体の形成に基づく発光による 1 つの区分領域全体からの総光量である請求項 1 記載の方法

【請求項 3】 前記発光が蛍光の発光である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 前記発光が化学発光である請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】 前記複数種のプローブを用いて、正常検体核酸と反応した場合に強いシグナルを与え得る少なくとも 1 種のプローブを含む区分領域と、正常検体核酸と反応した場合に弱いシグナルを与える得る少なくとも 1 種のプローブを含む区分領域と、正常検体核酸と反応した場合にハイブリッドを形成しない少なくとも 1 種のプローブを含む区分領域とをそれぞれを独立して所定の配列で配置した区分領域群を基板上に用意し、該区分領域群に対して正常検体核酸を反応させて、該区分領域群中の測定対象区分領域毎の全シグナルを測定し、該測定対象区分領域の配列に応じた全シグナルの第 1 の変化パターンを予め得る工程と、

該 DNA 基板の区分領域群に対して検体核酸を反応させて、該区分領域群中の

測定対象区分領域毎の全シグナルを測定し、該測定対象区分領域の配列に応じた全シグナルの第 2 の変化パターンを得る工程と、

前記第 1 の変化パターンと前記第 2 の変化パターンとを比較して、前記検体核酸中の変異の有無を判定する工程と、
を有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 前記測定対象区分領域が、正常検体核酸と反応した場合に全シグナルが最も強い区分領域と、全シグナルが最も弱い（シグナルがない場合を含む）区分領域である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 前記区分領域群を構成する各区分領域が、シグナル測定装置の検出部の前記基板に対する相対的な移動方向において、正常検体核酸と反応した場合に全シグナルの最も強い領域から、全シグナルの強度が順に弱くなるように並べてある請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】 前記区分領域群に正常検体核酸と反応した場合に全シグナルがゼロである区分領域を設け、該区分領域に検体核酸との反応で測定される全シグナルを測定し、シグナルが検出された場合に変異があるとする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】 前記正常検体核酸と反応した場合に全シグナルが最も強い区分領域が、正常検体核酸との完全対合プローブと、正常検体核酸と不対合な塩基が 1 塩基であるプローブを含む請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 10】 全シグナルの検出がエリアセンサーで行われる請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 11】 全シグナルの検出がラインセンサーで行われる請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】 前記複数種のプローブの長さが 8 m e r から 3 0 m e r の長さである請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】 該複数種のプローブの長さが 1 2 m e r から 2 5 m e r の長さである請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】 検体の核酸中における変異を監視するための DNA アレイ基板であって、

基板上に、検体核酸に対し完全に相補的である完全対合プローブと、該検体に対して不対合な塩基を少なくともひとつ備える複数種の不対合プローブとからなる複数種のプローブが配置されており、

正常な塩基配列と反応した場合において、強いシグナルを与える少なくとも1種のプローブが配置された区分領域と、弱いシグナルを与える少なくとも1種のプローブが配置された区分領域及びシグナルを与えない少なくとも1種のプローブが配置された区分領域の少なくとも一方がそれぞれが独立して配置されていることを特徴とするDNAアレイ基板。

【請求項15】 前記シグナルが蛍光である請求項14に記載のDNAアレイ基板。

【請求項16】 前記シグナルが化学発光である請求項14に記載のDNAアレイ基板。

【請求項17】 該強いシグナルを与える区分領域が完全対合プローブと、該検体に対して不対合な塩基を1つ備える不対合プローブと、含む請求項14に記載のDNAアレイ基板。

【請求項18】 前記複数の区分領域がシグナル測定装置での測定方向において、正常検体核酸と反応した場合に全シグナルの最も強い領域から、全シグナルの強度が順に弱くなるように並べてある請求項14に記載のDNAアレイ基板。

【請求項19】 前記複数種のプローブの長さが8merから30merの長さである請求項14～18のいずれかに記載のDNAアレイ基板。

【請求項20】 該複数種のプローブの長さが12merから25merの長さである請求項19記載の方法。

【請求項21】 請求項14～20のいずれかに記載のDNAアレイ基板と、該DNAアレイ基板の区分領域からのシグナルを測定するシグナル測定装置とを有することを特徴とする変異検出システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子の変異のスクリーニングなどに有用な変異検出方法及び変異検出システムに関する。

【0002】

【従来技術】

核酸等の物質の配列を決定し、或いはその配列をチェックする手法のひとつにDNAアレイを利用する方法がある。USP5445934には、1インチ角に10万個以上のオリゴヌクレオチドプローブを結合したDNAアレイの開示がある。このようなDNAアレイは、少量の検体で一度に多項目を検査できるという利点がある。チップ上に配置したこのようなDNAアレイに対して蛍光標識した調べたい試料を流すと、チップ上のプローブと相補的な配列を有するDNA断片はプローブと結合してハイブリッド体を形成し、このハイブリッド体が形成された部分だけを蛍光により識別できるようにしておくことでDNA試料中のDNA断片の配列を解明することができる。

【0003】

Sequencing by Hybridization(SBH)法は、このようなDNAアレイを利用し塩基配列を調べる方法で、USP5202231にその詳細が記載されている。SBH法では、ある長さについて可能なオリゴヌクレオチドの全配列を基板上に並べ、検体DNAとのハイブリダイゼーション反応によって形成される完全に相補的なハイブリッドを検出するもので、完全に相補的なハイブリッド体のセットを得れば、そのセットは、ある配列について1塩基ずつずれた配列の集合になるはずであり、それらを抽出して判定を行うものである。

【0004】

SBHに限らず、オリゴヌクレオチドと検体DNAの相補性を調べるときには、ひとつの検査項目について1種類のプローブでハイブリッドの有無を判定することは非常に難しい。それは、ハイブリッドの安定性がそれぞれの配列により異なり、完全に相補的であると判定できるシグナルの絶対値というものが存在しないからである。そこで、完全マッチのものと、完全マッチのものより幾分強度が弱くなる1塩基のミスマッチを含むハイブリッド体のシグナル強度を比較して判定する方法がScience vol. 274 p610-614, 1996に記

載されている。この方法では、15merのオリゴヌクレオチドのプロープ配列の真ん中に1塩基ミスマッチを配した配列を用意し、完全マッチと1塩基ミスマッチとのハイブリッド由来の蛍光強度を比較し、完全マッチの方が強度がある割合以上強いときにポジティブと判定する。

【0005】

さらに、USP5733729にはより正確な判定を行うために、得られたハイブリッド体の蛍光強度の比較から検体の塩基配列を知るためのコンピューターを用いた方法に関する記載がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、実際には各ハイブリッドにおける結合の強さは、それぞれの塩基配列中のGC含量等によっても異なり、完全マッチ配列と1塩基ミスマッチ配列との強度差も配列によってかなり幅がある。そのため、上述のような15merのオリゴヌクレオチドを用い、真ん中に1塩基ミスマッチを有する他の3種類のプロープとの比較を行って完全マッチか否かを判定するという方法は、それぞれの安定性を、理論的に或いは経験的に評価し、それとの比較を行うことによってより精度を得ることができる。

【0007】

また、これらの正確な判定のためには、シグナルの高精度定量が必要になり、通常、共焦点レーザー顕微鏡のような精密な装置が必要である。さらに、ひとつひとつのプロープに関してそのハイブリッド体の強度を計測し、その値を解析して遺伝子配列を決定、判定するためには、アレイを読みとる検出装置の他に、更に大がかりなコンピューター装置を必要とし、誰もが容易にDNAアレイを利用する場合の障害になる。

【0008】

一方、このようなDNAアレイを用いた遺伝子診断は、集団検診や個々人の遺伝子検査、或いは、遺伝子多系の研究にも利用しうるが、このような特定項目について大部分が正常な中から変異している検体を探し出すといった大量の検体を迅速に安価に処理するという用途には、必ずしも上述のような精密な測定及び解

析は必要ない。しかも、上記のような精密な装置および解析はコストがかかる。そこで、先ずは変異の有無をスクリーニングし、スクリーニングの結果変異が疑われる場合にのみ、詳細な検査を行うという考え方がコスト上でも、時間の上でも節約になる。

【 0 0 0 9 】

本発明はこのような問題点に鑑みなされたものであり、本発明の目的は高価な装置及び複雑な解析を必要とせず、遺伝子の変異の有無のみを迅速に決定するマスキングに適した方法を提供することにある。

【 0 0 1 0 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、遺伝子に関する情報により既に正常な遺伝子と変異している遺伝子の塩基配列が確定されている場合について、正常な遺伝子とハイブリッドを形成した場合に強いシグナルを与えるプローブ配列群と、変異している遺伝子とハイブリッドを形成すると予想される配列を持つプローブ群とを別々の領域に配置したDNAアレイを提供する。また、このようなアレイを用いた検出方法を提供することで上記の目的を達成するものである。

【 0 0 1 1 】

本発明にかかる検体核酸中における変異を監視するために変異を判定する方法の一態様は、検体核酸中における変異を監視するための変異判定方法であって、

検体核酸の被部検出部に対し完全に相補的である完全対合プローブと、該被検出部に対して不対合な塩基を少なくともひとつ備える複数種の不対合プローブとを含む複数種のプローブを、基板上の所定の複数の区分領域中に分配配置して固定したDNAアレイ基板を用意する工程と、

該DNAアレイ基板上のプローブに対して検体核酸を反応させる工程と、

前記プローブのいずれかと前記検体核酸とのハイブリッド体の形成に基づくシグナルを、前記複数の区分領域ごとの全シグナルとして測定する工程と、

前記複数の区分領域ごとの全シグナルの変化のパターンから前記検体の核酸中の変異を判定する工程

とを有することを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

本発明にかかる検体核酸中における変異を監視するために変異を判定する方法の他の態様は、前記複数種のプローブを用いて、正常検体核酸と反応した場合に強いシグナルを与え得る少なくとも1種のプローブを含む区分領域と、正常検体核酸と反応した場合に弱いシグナルを与える得る少なくとも1種のプローブを含む区分領域と、正常検体核酸と反応した場合にハイブリッドを形成しない少なくとも1種のプローブを含む区分領域とをそれぞれを独立して所定の配列で配置した区分領域群を基板上に用意し、該区分領域群に対して正常検体核酸を反応させて、該区分領域群中の測定対象区分領域毎の全シグナルを測定し、該測定対象区分領域の配列に応じた全シグナルの第1の変化パターンを予め得る工程と、

該DNA基板の区分領域群に対して検体核酸を反応させて、該区分領域群中の測定対象区分領域毎の全シグナルを測定し、該測定対象区分領域の配列に応じた全シグナルの第2の変化パターンを得る工程と、

前記第1の変化パターンと前記第2の変化パターンとを比較して、前記検体核酸中の変異の有無を判定する工程と、
を有する。

【 0 0 1 3 】

本発明にかかるDNAアレイ基板は、検体の核酸中における変異を監視するためのDNAアレイ基板であって、

基板上に、検体核酸に対し完全に相補的である完全対合プローブと、該検体に対して不対合な塩基を少なくともひとつ備える複数種の不対合プローブとからなる複数種のプローブが配置されており、

正常な塩基配列と反応した場合において、強いシグナルを与える少なくとも1種のプローブが配置された区分領域と、弱いシグナルを与える少なくとも1種のプローブが配置された区分領域及びシグナルを与えない少なくとも1種のプローブが配置された区分領域の少なくとも一方がそれぞれが独立して配置されていることを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

また、本発明にかかる変異検出システムは、上記構成のDNAアレイ基板と、

該DNAアレイ基板の区分領域からのシグナルを測定するシグナル測定装置とを有することを特徴とする。

【0015】

本発明によれば、本発明の目的は高価な装置及び複雑な解析を必要とせず、遺伝子の変異の有無のみを迅速に決定するマスキリングに適した方法を提供することができる。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明について、区分領域からのシグナルが蛍光である場合を例として以下に説明を行うが、本発明におけるシグナルは蛍光に限定されたものではなく、他の光学発光によるシグナルでも良く、更に電氣的なものでも良い。

【0017】

まず、ハイブリッド体を構成する核酸鎖間の結合に関しては、その強度は種々の要因によって支配されており、15merから20mer程度の長さのプロープを用いた場合に、1塩基ミスマッチを有するハイブリッド体を完全に除くことは実用上困難である。

【0018】

蛍光といった光による検出においてハイブリッド体がシグナルを発する場合を例にとると、2塩基ミスマッチを有する配列では、2塩基ミスマッチの位置、連続、不連続にかかわらず、1塩基ミスマッチ体よりは急激に安定性が低くなり、3塩基ミスマッチ体ではほとんどシグナルが観測されない。しかし、1塩基ミスマッチ体では強度が完全マッチの50%程度有することもあり得る。正常な核酸の場合には、完全対合プロープ（完全マッチプロープ）及び不对合の塩基が1つである不对合プロープ（1塩基ミスマッチプロープ）が配置された領域で際だった光量を示し、一方、ハイブリッドの安定性が低い領域では総光量は限りなくゼロに近い。それに対し、変異を持つ核酸が完全に相補的であるプロープは、正常核酸に対応するプロープとはミスマッチを示し、正常核酸において高い蛍光が期待される区分領域の蛍光強度は弱くなる。また、正常核酸との反応ではシグナルが低いと予想されている区分領域に完全マッチ或いは1塩基ミスマッチに由来す

る蛍光が出現する。従って、区分された領域毎の蛍光分布を比較することにより正常核酸と変異核酸とを区別することが可能になる。

【 0 0 1 9 】

このような判定をより精度良く行うためのひとつの手段として、本発明では、正常核酸で各プローブとのハイブリダイゼーション反応を行い、その結果得られる各区分領域毎の蛍光強度を基に、強い強度を与えるプローブ群を有する区分領域と、蛍光を与えないプローブ群を有する区分領域と、弱い蛍光を発する中間的な蛍光強度のプローブ群を有する区分領域に区分けし、これらを基板上に所定の配列で配置したDNA基板を用いる。

【 0 0 2 0 】

検査を同時多項目行おうとする場合には、それぞれの項目のプローブに対して完全マッチ、ミスマッチの蛍光強度を評価し、全て統合してその強度に順番付けを行い、上記グループに分別し並べることが重要になる。このように区分領域を所定に配列で並べることで、この配列に応じた全シグナルの変化のパターンを得ることができ、正常核酸で得られた変化のパターンを予め特定しておき、検出対象である核酸で得られた変化のパターンをこれと比較して変異を検出することができる。

【 0 0 2 1 】

その並べ方はセンサーの種類によって決めることができる。例えば、仮に、各区分領域が、正常核酸と反応した場合に蛍光強度の強い順に基板の左端から並べられている場合には、ラインセンサーを用いて検出すると、蛍光強度は左端で最大で、徐々に減少し、基板の右端に近づくに連れてゼロの領域が続く。また、領域をエリアセンサーで評価する場合には、最大蛍光を与えるプローブ群を有する区分領域と蛍光を与えないプローブ群を有する検出対象としての区分領域の最低2カ所の蛍光光量評価が必要となる。

【 0 0 2 2 】

さらに具体的に説明する。

【 0 0 2 3 】

本発明では、例えば、DNAアレイ上に正常核酸とハイブリッドを形成するプ

ローブを含む区分領域と、変異遺伝子とハイブリッドを形成するプローブを含む区分領域とを独立して設定し、正常核酸に対応するプローブ群とのハイブリッド体からのシグナルと、変異遺伝子とのハイブリッド体からのシグナルとの比をとることにより、正常か否かを判定する方法が利用される。

【0024】

しかし、実際には変異核酸として正常核酸と1塩基のみ異なるプローブのみを選択したのではその比は2倍程度にしかならず、一部に変異遺伝子を含んでも総光量としての変化は少なく判定が困難である。

【0025】

そこで、より正確な判定を行うために、本発明では、マススクリーニングにおいて大部分の検体が示す正常な核酸配列に対して、完全マッチ配列および1塩基ミスマッチ配列であるプローブをDNAアレイ基板上の特定の領域に集めて配置する。さらに、2塩基ミスマッチ、3塩基ミスマッチのような低い安定性を示すプローブを、上記高い安定性を示す領域とは異なる領域に配置する方法が好ましい。そして、このように配置されたDNAアレイ基板を用いてハイブリダイゼーション反応を行ない、各区分領域についてシグナルの総量を測定し、検出対象としての核酸からの測定パターンを正常核酸で得られる測定パターンと対比させて、変異の有無を検定することができる。

【0026】

例えば18塩基長のプローブ中に3カ所に異なる塩基を配置した配列64種（ $4 \times 4 \times 4 = 64$ ）の場合（表1：各配列は左側が5'末端で右側が3'末端である）には、どのようなサンプルを用いても完全に一致する配列は1種類存在するはずであり、さらに9種が1塩基ミスマッチ、27種が2塩基ミスマッチ、残り27種が3塩基ミスマッチとなるはずである。そして、完全マッチ配列と1塩基ミスマッチ配列では蛍光が観察され、3塩基ミスマッチでは蛍光は観察されないようなハイブリダイゼーション反応の条件を設定することは比較的容易である。2塩基ミスマッチに関しては、配列によりハイブリッド体を形成するものではないものがある。

【0027】

【表 1】

表 1

配列番号	配列	配列番号	配列
1	GATGGGACTCAAGTTCAT	33	GATGGGCTCAAGTTCAT
2	GATGGGACTCAGGTTTCAT	34	GATGGGCTCAGGTTTCAT
3	GATGGGACTCACGTTTCAT	35	GATGGGCTCACGTTTCAT
4	GATGGGACTCATGTTTCAT	36	GATGGGCTCATGTTTCAT
5	GATGGGACTCGAGTTCAT	37	GATGGGCTCGAGTTCAT
6	GATGGGACTCGGGTTTCAT	38	GATGGGCTCGGGTTTCAT
7	GATGGGACTCGCGTTCAT	39	GATGGGCTCGCGTTCAT
8	GATGGGACTCGTGTTTCAT	40	GATGGGCTCGTGTTTCAT
9	GATGGGACTCCAGTTCAT	41	GATGGGCTCCAGTTCAT
10	GATGGGACTCCGGTTCAT	42	GATGGGCTCCGGTTCAT
11	GATGGGACTCCCGTTCAT	43	GATGGGCTCCCGTTCAT
12	GATGGGACTCCIGTTCAT	44	GATGGGCTCCIGTTCAT
13	GATGGGACTCTAGTTCAT	45	GATGGGCTCTAGTTCAT
14	GATGGGACTCTGGTTCAT	46	GATGGGCTCTGGTTCAT
15	GATGGGACTCTCGTTCAT	47	GATGGGCTCTCGTTCAT
16	GATGGGACTCTTGTTTCAT	48	GATGGGCTCTTGTTTCAT
17	GATGGGGCTCAAGTTCAT	49	GATGGGCTCAAGTTCAT
18	GATGGGGCTCAGGTTTCAT	50	GATGGGCTCAGGTTTCAT
19	GATGGGGCTCACGTTTCAT	51	GATGGGCTCACGTTTCAT
20	GATGGGGCTCATGTTTCAT	52	GATGGGCTCATGTTTCAT
21	GATGGGGCTCGAGTTCAT	53	GATGGGCTCGAGTTCAT
22	GATGGGGCTCGGGTTCAT	54	GATGGGCTCGGGTTCAT
23	GATGGGGCTCGCGTTCAT	55	GATGGGCTCGCGTTCAT
24	GATGGGGCTCGTGTTTCAT	56	GATGGGCTCGTGTTTCAT
25	GATGGGGCTCCAGTTCAT	57	GATGGGCTCCAGTTCAT
26	GATGGGGCTCCGGTTCAT	58	GATGGGCTCCGGTTCAT
27	GATGGGGCTCCCGTTCAT	59	GATGGGCTCCCGTTCAT
28	GATGGGGCTCCIGTTCAT	60	GATGGGCTCCIGTTCAT
29	GATGGGGCTCTAGTTCAT	61	GATGGGCTCTAGTTCAT
30	GATGGGGCTCTGGTTCAT	62	GATGGGCTCTGGTTCAT
31	GATGGGGCTCTCGTTCAT	63	GATGGGCTCTCGTTCAT
32	GATGGGGCTCTTGTTTCAT	64	GATGGGCTCTTGTTTCAT

【 0 0 2 8 】

これらの64種のプローブを強度の強い方から8プローブ毎にグループ分けを行なうと、第1グループの蛍光強度は極めて強く、第6、7、8番目のグループの総蛍光量はゼロになるはずである。このような蛍光強度による分類は、経験的に行っても、計算により理論的に行っても良い。

【0029】

次に、実際の系についてハイブリダイゼーション反応を行い、分類されたグループ毎の蛍光量の総量を測定する。特に第6、7、8番目のグループの蛍光量は重要な意味を持つ。これらのグループは蛍光量が検出されないことが予想されるが、期待に反し蛍光が検出された場合には、検体は正常ではなくその配列の一部に変異を有することがわかる。蛍光が検出されない場合、その多くは正常な配列の場合である。

【0030】

しかし、より正確さを期するために第1グループの蛍光量を正常な場合と比較することが必要である。正常な配列のハイブリダイゼーション反応から期待される値より明らかに低い場合には、塩基の変異が疑われる。さらに中間の蛍光強度を持つ領域、つまり第2、3、4グループの蛍光強度分布（蛍光の変化のパターン）を正常なものと比べなければならない。

【0031】

上記方法のさらに効果的な変異の検出方法として、プローブを片方の端からの完全マッチ、1塩基ミスマッチ、2塩基ミスマッチ、3塩基ミスマッチという具合に、シグナル強度が高い方から低い方へ順番に並べ、完全マッチのプローブが配置されている領域とは反対の領域ではシグナルがゼロになるように配置する方法が考えられる。この場合には全体の蛍光強度分布パターンが判定の基準となる。例えば、図1(a)に示す区分領域（縦一列が一つの区分領域となる）の配置を用いた場合、正常な場合には図1(b)に示すような単調減少のパターンを示し、変異がある場合には中間部分にピークを持つようなパターンに変化する。

【0032】

上記配置方法は多項目検査用プローブが同一基板上に配置された場合でも同様である。すべての項目について、先ず完全にマッチするプローブ配列、1塩基ミスマッチ配列、2塩基ミスマッチ配列といった具合に、蛍光強度が強いと予想される順に並べる。

【0033】

このような考え方は、単に3塩基についての変異を評価する上記方法に限らず

、変異の数に制限なく普遍的に適応できる。

【0034】

なお、正常核酸とプローブとがハイブリッド体が形成された場合にシグナルが得られる場合について説明したが、シグナルを発生させる方式によっては、ハイブリッド体が形成された場合にシグナルが得られず、ハイブリッド体が形成されない場合にシグナルが得られるようにしてもよい。

【0035】

検体としての核酸としては、検査対象としての遺伝子から、必要に応じて検出に必要な部分を取り出して用いることができる。更に、対照として用いる正常核酸は、既知の配列から合成して用いることができる。

【0036】

基板上に固定するプローブの長さは、検出に適合した長さとするればよく、例えば 8mer ~ 30mer の範囲が好ましく、12mer ~ 25mer の範囲がより好ましい。

【0037】

基板へのプローブの固定は、種々の方法で行なうことができるが、プローブが固定したスポットを高密度で効率良く、高速で配置するためには、インクジェット方式による液滴付与を利用することが好ましい。

また、区分領域内に付与するプローブの量は、各スポットは、70 ~ 100 μ m が好ましく、間隔は各スポットが連結しない程度にすることが好ましい。

【0038】

スポット数は、蛍光強度が強いと予想されるスポットのみが、まとめて測定でき、蛍光が全く期待されないスポットが、まとめて一度に測定できるようにセンサの構成を考えて設定する。

【0039】

本発明の変異検出システムは、複数の区分領域が所定の配列で配置された DNA アレイ基板と、測定対象区分領域でのシグナルの測定装置とを有する。なお、複数の区分領域を設けた DNA アレイ基板を用いた変異の有無の判定においては、全部の区分領域からのシグナルを検出し、その結果を変異の有無の判定に利用

する方法、あるいは変異の有無を検出できるように選択した一部の区分領域からのシグナルを検出する簡便法を用いることができる。

【0040】

この検出システムでは、コンピュータと接続させて、区分領域の配列に応じた各区分領域からの全シグナルの測定値をコンピュータで解析して全シグナルの変化のパターンを作成させて記憶させて、基準となる正常核酸からの変化のパターンと検体からの変化のパターンを比較させて、変異の可能性の有無の判定を出力させることができる。

【0041】

シグナル検知用のセンサーとしては、各種フォトダイオード（例えば、浜松ホトニクス社製等）、例えば分割型シリコンフォトダイオードアレイでは、各種ラインセンサ及びエリアセンサとして使用することが可能なものがあり、特に受光面サイズが1ないし2mm×(2～3)mmのものが好適に用いられる。などが用いられる。

【0042】

【実施例】

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。なお、以下における「%」は「質量%」を示す。

実施例1

変異遺伝子検出用のDNAアレイ作製（ラインセンサー用）

1) 64種のプロープが結合したDNAアレイ作製

(1) プロープの設計

癌抑制遺伝子であるp53遺伝子の248番目、249番目のアミノ酸配列に対応する塩基配列CGGAGGの中での変異の中で頻度が高いのは、1番目のCがTに、2番目のAがGに、そして249番目のアミノ酸3番目のGがTに変異している場合であることが知られている。そこで、この3カ所の塩基配列に着目して64種のプロープを設計した。

【0043】

つまり、プロープ全長を18merとし、その真ん中にこの変異を含む6塩基

を位置させ、その前後を共通配列で挟んだ構造で、5' - ATGAACNNGA
GNCCATC - 3' である。ここで、Nと表した部分が4種の核酸塩基であるA、G、C、Tに対応する。プローブDNAは、検出したい配列（上記配列）と相補的な配列であるので、実際には、5' - GATGGGNCTCNGTT
CAT - 3' となる。

【0044】

図2には64種DNAプローブのDNAアレイ上での配置図を示した。正常な遺伝子に相当する配列である5' - ATGAACCGGAGGCCATC - 3' は、右から3列目、上から3行目の位置にある42番のプローブDNA 5' - GATGGGCCTCCGGTTCAT - 3' とハイブリッドを形成することが期待される。

(2) マレイミド基導入基板の作製

(基板洗浄)

1インチ角のガラス板をラックに入れ、超音波洗浄用洗剤に一晩浸した。その後、洗剤中で20分間超音波洗浄を行い、その後、水洗により洗剤を除去した。蒸留水ですすいだ後、蒸留水のはいった容器中でさらに超音波処理を20分間行った。次に、あらかじめ加温してあった1N水酸化ナトリウム溶液に10分間浸した。引き続き水洗、蒸留水洗浄を行った。

(表面処理)

1%シランカップリング剤水溶液（信越化学工業社製、商品名KBM603）に室温で20分浸し、その後、窒素ガスを両面に吹き付けて、水分を飛ばし、乾燥させた。120℃に加熱したオーブンで1時間バークしシランカップリング処理を完結させた。続いて、EMCS（N-（6-Maleimidocaproyloxy）succinimide：Dojin社製）を2.7mg秤量し、DMSO/エタノールの1：1溶液に溶解した（最終濃度0.3mg/ml）。シランカップリング剤処理を行ったガラス基板をこのEMCS溶液に2時間浸し、シランカップリング剤のアミノ基とEMCS溶液のカルボキシル基を反応させた。この状態でガラス表面にはEMCS由来のマレイミド基が表面に存在することになる。EMCS溶液と反応させたガラス板は蒸留水で洗浄後、窒素ガスで乾

燥させ、DNAとの結合反応に用いられる。

(3) DNAの基板への結合反応

(64種DNAプローブの合成)

5'末端にSH基(チオール基)を有する64種のプローブ一本鎖DNA(先の表1に記載)を定法により合成した。

(DNAプローブの吐出)

各プローブDNAをそれぞれ水に溶解し、SGクリア(グリセリン7.5%、尿素7.5%、チオジグリコール7.5%、アセチレノールEH 1%を含む水溶液)を用いて最終濃度8 μ Mになるよう希釈した。

【0045】

少量のサンプルが吐出できるように改造したBJプリンター用ヘッドBC62(キヤノン社製)のノズルにプローブDNAの溶液を100 μ l充填した。各ヘッドあたり6種のDNAが吐出できるようにして2つヘッドを用い、一度に12種のDNAを吐出し、ヘッドを6回交換して、64種のDNAのそれぞれのスポットが独立して形成されるように吐出させた。こうして所定の区分領域が所定の配列で配置されたDNAアレイを得た。この時のプローブアレイを含む各スポットのピッチは200 μ mであった。また8 \times 8のスポットが形成する領域は、約2mm \times 2mmであった。

【0046】

その後、基板を30分加湿チャンバー中に放置し、プローブDNAを基板に結合させて固定する反応を行い、DNAアレイ基板を得た。

2. 正常なp53配列を用いたときの64種のハイブリッド体の蛍光強度測定

(1) ハイブリダイゼーション反応

(ブロッキング反応)

1M NaCl/50mMリン酸緩衝液(pH7.0)溶液にてDNAアレイ基板を洗い、ガラス表面の固定されてないDNA溶液を完全に洗い流した。その後、2%ウシ血清アルブミン水溶液中に浸し、2時間放置し、ブロッキング反応を行った。

(モデル検体DNAの合成)

p53 遺伝子の正常な配列 (No. 42 と相補的) を持ち、プローブ DNA と同じ領域で同じ長さの標識 DNA No. 65 (一本鎖) を作製した。配列は下に示す通りで、5' 末端にはローダミン (Rho) を結合してある。

No. 65 : 5' -Rho-ATGAACCGGAGGCCCATC-3'

(ハイブリダイゼーション反応条件)

DNA アレイ基板の入ったハイブリダイゼーション反応用の容器に 100 mM NaCl を含む 50 nM モデル検体 DNA 溶液を 2 ml 入れ、最初に 70℃ で 30 分加熱後、インキュベーターの温度を 40℃ に下げ、そのまま 3 時間反応させた。

(2) 検出

(方法)

検出は、蛍光顕微鏡 (ニコン社製) に画像解析処理装置 ARGUS (浜松ホトニクス社製) を接続して行った。

(3) 結果

得られた蛍光量の基板上の分布を図 3 に示す。

【0047】

実施例 2

変異遺伝子検出用の DNA アレイ作製 (ラインセンサー用)

(1) 変異検出用 DNA アレイの作製

上記結果を基に、これらの 64 種のプローブを強度の強い方から 8 プローブ毎にグループ分けを行ったのが表 2 及び 3 である。第 1 グループの蛍光強度は極めて強く、第 6、7、8 番目のグループの総蛍光量はゼロになるはずである。

【0048】

【表2】

表2

グループ番号	配列番号	ミスマッチの種類
1	42	完全マッチ
	58	1塩基ミスマッチ
	34	1塩基ミスマッチ
	41	1塩基ミスマッチ
	46	1塩基ミスマッチ
	10	1塩基ミスマッチ
	44	1塩基ミスマッチ
	43	1塩基ミスマッチ
2	26	1塩基ミスマッチ
	38	1塩基ミスマッチ
	50	2塩基ミスマッチ
	2	2塩基ミスマッチ
	6	2塩基ミスマッチ
	9	2塩基ミスマッチ
	11	2塩基ミスマッチ
	12	2塩基ミスマッチ
3	14	2塩基ミスマッチ
	18	2塩基ミスマッチ
	22	2塩基ミスマッチ
	25	2塩基ミスマッチ
	27	2塩基ミスマッチ
	28	2塩基ミスマッチ
	30	2塩基ミスマッチ
	33	2塩基ミスマッチ
4	35	2塩基ミスマッチ
	36	2塩基ミスマッチ
	37	2塩基ミスマッチ
	39	2塩基ミスマッチ
	40	2塩基ミスマッチ
	45	2塩基ミスマッチ
	47	2塩基ミスマッチ
	48	2塩基ミスマッチ

【0049】

【表3】

表3

グループ番号	配列番号	ミスマッチの種類
5	54	2塩基ミスマッチ
	57	2塩基ミスマッチ
	59	2塩基ミスマッチ
	60	2塩基ミスマッチ
	62	2塩基ミスマッチ
	1	3塩基ミスマッチ
	3	3塩基ミスマッチ
	4	3塩基ミスマッチ
6	5	3塩基ミスマッチ
	7	3塩基ミスマッチ
	8	3塩基ミスマッチ
	13	3塩基ミスマッチ
	15	3塩基ミスマッチ
	16	3塩基ミスマッチ
	17	3塩基ミスマッチ
	19	3塩基ミスマッチ
7	20	3塩基ミスマッチ
	21	3塩基ミスマッチ
	23	3塩基ミスマッチ
	24	3塩基ミスマッチ
	29	3塩基ミスマッチ
	31	3塩基ミスマッチ
	32	3塩基ミスマッチ
	49	3塩基ミスマッチ
8	51	3塩基ミスマッチ
	52	3塩基ミスマッチ
	53	3塩基ミスマッチ
	55	3塩基ミスマッチ
	56	3塩基ミスマッチ
	61	3塩基ミスマッチ
	63	3塩基ミスマッチ
	64	3塩基ミスマッチ

【0050】

次に、基板上をライン状に8分割し、左側から強度の高い順に、第1グループ、第2グループという具合に並べ、右端に第8グループが並ぶように設定した。

次に対応するプローブ番号の位置へ実施例 1 と同様、インクジェット法を用いて図 4 のようにプローブを並べ、変異検出用 DNA アレイを作製した。各グループが構成するラインは 2 0 0 μ m の幅である。

(2) 変異検出用 DNA アレイを用いた正常遺伝子での検討

実施例 1 と同様な条件でハイブリダイゼーション反応を行った。その後、ラインセンサー (S272102; 浜松ホトニクス社製) を用いて各グループ毎の総光量を検出した。

【 0 0 5 1 】

結果を図 4 及び 5 に示す。第 1 グループでの光量が最大で、第 2 グループではその強度は半分以下に減少する。第 6、7、8 グループでは蛍光はほとんど観測されない。

(実施例 3)

(変異遺伝子検出用の DNA アレイを用いた変異遺伝子の検出 (1))

1. 変異モデル検体 DNA の合成

p 5 3 遺伝子の正常な配列とはプローブ領域で 1 塩基異なる配列 (No. 4 6 と相補的) を持ち、プローブと同じ長さの標識 DNA No. 6 6 を作製した。配列は下に示す通りで、5' 末端にはローダミンを結合してある。アンダーラインを施したところが変異箇所である。

No. 6 6 : 5' - R b o - A T G A A C C A G A G G C C C A T C - 3'

(ハイブリダイゼーション反応)

実施例 1 と同様にハイブリダイゼーション反応を行った。モデル検体 DNA の濃度は 5 0 nM である。

(ラインセンサーによる検出)

実施例 2 と同様ハイブリダイゼーション反応後のアレイ基板をラインセンサーにより評価した。図 6 に示す通り、正常遺伝子の時には蛍光が観察されなかった第 6、7、8 グループに蛍光が観察され、この検体遺伝子が正常ではないことが容易に判断された。また、第 1 グループと第 4 グループ (プローブ番号 3 5 - 4 8) での蛍光強度が高いことから、正常遺伝子と極めて近い配列で図 2 における右上の領域に変異を有していることが推察される。

【0052】

この結果から、本発明の変異遺伝子スクリーニング方法が極めて有効であることが示された。

【0053】

実施例4

(変異遺伝子検出用のDNAアレイを用いた変異遺伝子の検出(2))

ハイブリダイゼーション反応に用いるモデル標的遺伝子の濃度を5 nMに変化させ、実施例3と同様の条件によりハイブリダイゼーション反応を行った。結果を図7に示す。

【0054】

実施例3と同様な結果が得られ、本発明の方法がハイブリダイゼーション反応の条件によらず成り立つことが示された。

【0055】

実施例5

(変異遺伝子検出用のDNAアレイを用いた変異遺伝子の検出(3))

変異モデル検体DNAの合成

p53遺伝子の正常な配列とはプローブ領域で1塩基異なる配列(No. 10と相補的)を持ち、プローブと同じ長さの標識DNA No. 67を作製した。配列は下に示す通りで、5'末端にはローダミンを結合してある。アンダーラインを施したところが変異箇所である。

No. 67: 5' - R h o - A T G A A C C G G A G T C C C A T C - 3'

(ハイブリダイゼーション反応)

上記変異モデル検体DNAを用いて実施例1と同様ハイブリダイゼーション反応を行った。検体濃度は50 nMである。その結果を図8に示す。

【0056】

正常遺伝子では蛍光が観察されない第6、7グループで蛍光が見られ、正常遺伝子ではないことが判明した。蛍光は正常遺伝子で高い値を示す第1グループよりも第2グループで最大値を示し、第2グループに含まれるプローブ配列領域(図2における左上領域)に変異を有することが推定される。

【 0 0 5 7 】

この結果は、本発明の変異遺伝子のスクリーニング方法が変異の種類によらず可能であることを示している。

【 0 0 5 8 】

実施例 6

(変異遺伝子検出用のエリアセンサー用 DNA アレイの作製)

実施例 2 に示したグループに分けられたプローブをライン状ではなく基板上の区分けされた領域に配置し、図 9 に示す配置でプローブ溶液を吐出して DNA アレイを作製した。

【 0 0 5 9 】

次に実施例 4 で用いた変異モデル検体を用いてハイブリダイゼーション反応を行った。その結果、正常遺伝子では蛍光の観察されない第 6、7、8 グループで蛍光が観察され、この遺伝子の変異遺伝子であることが容易に判断された。

【 0 0 6 0 】

【発明の効果】

本発明によれば、高価な装置及び複雑な解析を必要とせず、遺伝子の変異の有無のみを迅速に決定するマススクリーニングに適した方法を提供することができる。

【 0 0 6 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>Canon INC.

<120>A method of screening a mutant gene

<130>3912042

<160>64

<210>1

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>1

gatgggactc aagtt cat

<210>2

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>2

gatgggactc aggtt cat

<210>3

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>3

gatgggactc acgtt cat

<210>4

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>4

gatgggactc atgtt cat

<210>5

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>5

gatgggactc gagtt cat

<210>6

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>6

gatgg gactc gggtt cat

<210>7

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>7

gatgggactc gcgttcat

<210>8

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>8

gatgggactc gtgttcat

<210>9

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>9

gatgggactc cagttcat

<210>10

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>10

gatgggactc cggttcat

<210>11

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>11

gatgggactc ccgttcat

<210>12

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>12

gatgggactc ctgttcat

<210>13

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>13

gatgggactc tagttcat

<210>14

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>14

gatgggactc tggttcat

<210>15

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>15

gatgggactc tcgttcat

<210>16

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>16

gatgggactct tgttcat

<210>17

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>17

gatggggctc aagtcat

<210>18

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>18

gatggggctc aggttcat

<210>19

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>19

gatggggctca cgttcat

<210>20

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>20

gatggggctc atgttcat

<210>21

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>21

gatggggctcg agttcat

<210>22

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>22

gatggggctc ggttcat

<210>23

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>23

gatggggctc gcgttcat

<210>24

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>24

gatggggctc gtgttcat

<210>25

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>25

gatggggctc cagttcat

<210>26

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>26

gatggggctc cgttcat

<210>27

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>27

gatggggctc ccgttcat

<210>28

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>28

gatggggctc ctgttcat

<210>29

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>29

gatggggctct agttcat

<210>30

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>30

gatggggctc tggttcat

<210>31

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>31

gatggggctc tcgttcat

<210>32

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>32

gatggggctc ttgttcat

<210>33

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>33

gatgggcctc aagttcat

<210>34

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>34

gatgggcctc aggttcat

<210>35

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>35

gatgggcctc acgttcat

<210>36

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>36

gatgggcctc atgttcat

<210>37

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>37

gatgggcctc gagttcat

<210>38

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>38

gatgggcctc gggttcat

<210>39

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>39

gatgggcctc gcgttcat

<210>40

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>40

gatgggcctc gtgttcat

<210>41

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>41

gatgggcctc cagttcat

<210>42

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>42

gatgggcctc cggttcat

<210>43

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>43

gatgggcctc ccgttcat

<210>44

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>44

gatgggcctc ctgttcat

<210>45

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>45

gatgggcctc tagttcat

<210>46

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>46

gatgggcctc tggttcat

<210>47

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>47

gatgggcctc tcgttcat

<210>48

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>48

gatgggcctc ttgttcat

<210>49

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>49

gatgggtctc aagttcat

<210>50

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>50

gatgggtctc aggttcat

<210>51

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>51

gatgggtctc acgttcat

<210>52

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>52

gatgggtctc atgttcat

<210>53

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>53

gatgggtctc gagttcat

<210>54

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>54

gatgggtctc gggttcat

<210>55

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>55

gatgggtctc gcgttcat

<210>56

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>56

gatgggtctc gtgttcat

<210>57

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>57

gatgggtctc cagttcat

<210>58

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample orionucleotide

<400>58

gatgggtctc cggttcat

<210>59

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>59

gatgggtctc ccgttcat

<210>60

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>60

gatgggtctc ctgttcat

<210>61

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>61

gatgggtctc tagttcat

<210>62

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>62

gatgggtctc tggttcat

<210>63

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>63

gatgggtctc tcgttcat

<210>64

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial sequence

<220>

<223>Sample origonucleotide

<400>64

gatgggtctc ttgttcat

【図面の簡単な説明】

【図 1】

(a) は DNA アレイ基板上の区分領域の配置の一例を示す図であり、(b) は、この基板を用いた測定においてラインセンサーを用いた場合に得られる区分領域の配置に対応した蛍光強度分布 (パターン) を示す図である。

【図 2】

64 種の DNA プローブの配置図である。

【図 3】

蛍光強度の結果を示す図である。

【図 4】

蛍光強度の結果を示す図であり、Gr. No. はグループ番号を表わす。

【図 5】

ラインセンサーを用いた場合に測定された区分領域の配置に対応して得られる蛍光強度分布 (パターン) を示す図である。

【図6】

ラインセンサーを用いた場合に測定された区分領域の配置に対応して得られる蛍光強度分布（パターン）を示す図である。

【図7】

ラインセンサーを用いた場合に測定された区分領域の配置に対応して得られる蛍光強度分布（パターン）を示す図である。

【図8】

ラインセンサーを用いた場合に測定された区分領域の配置に対応して得られる蛍光強度分布（パターン）を示す図である。

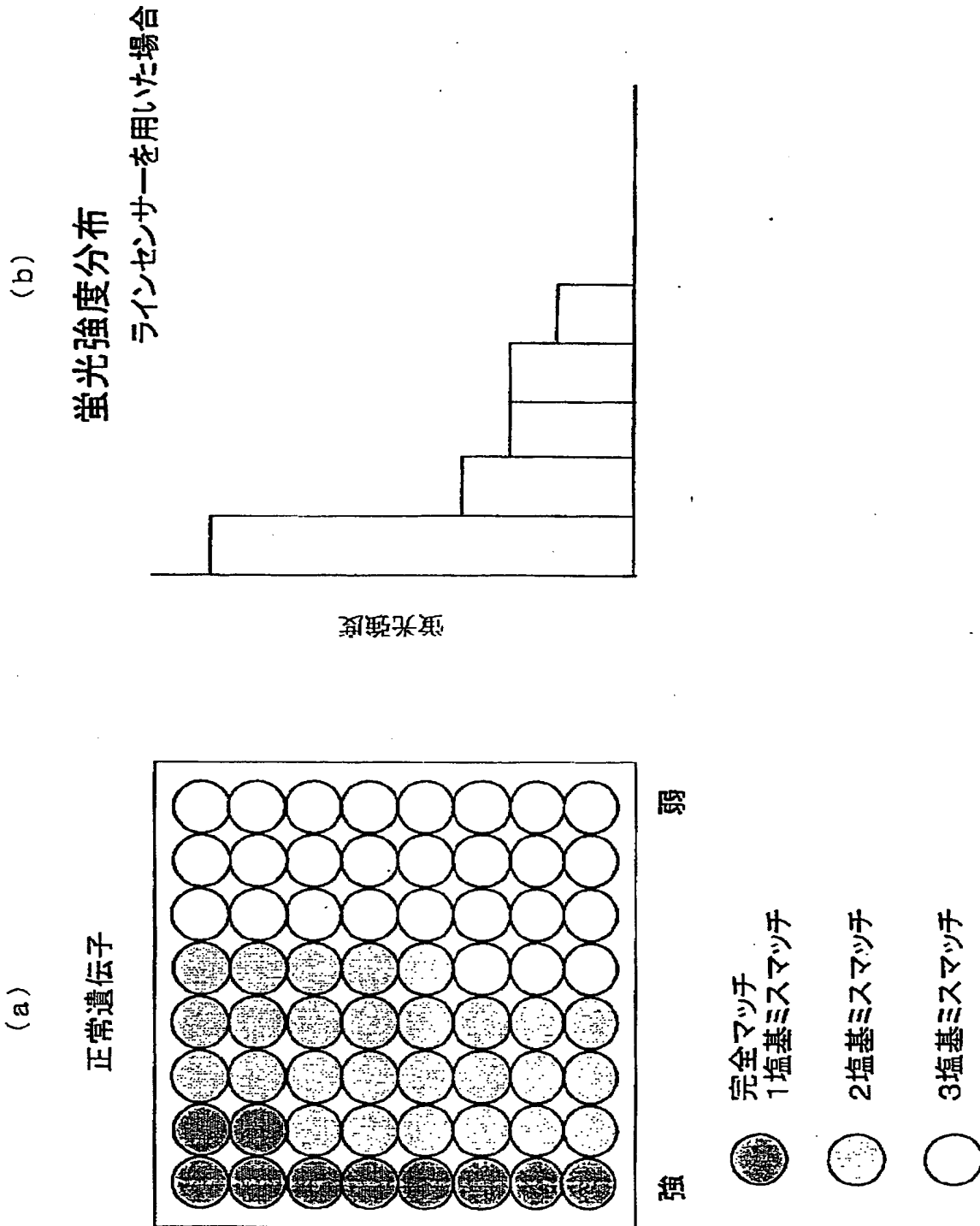
【図9】

蛍光強度の結果を示す図であり、Gr. No. はグループ番号を表わす。

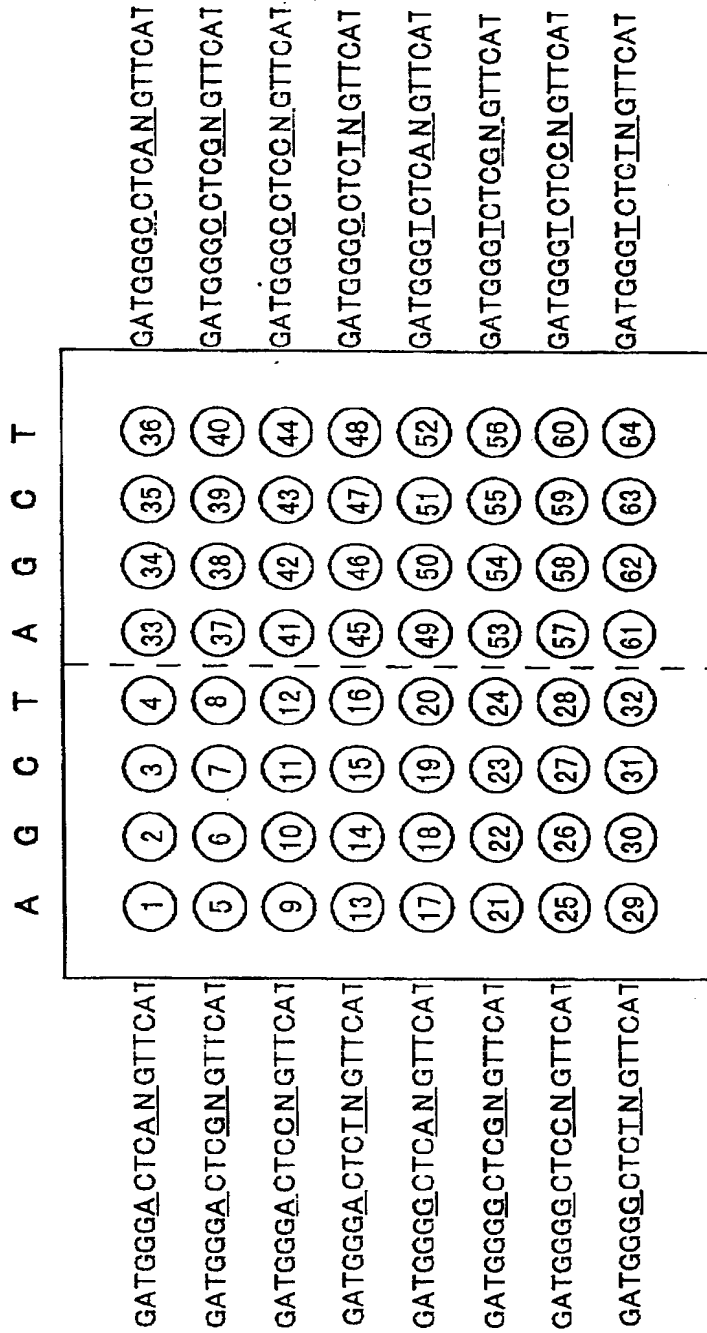
【書類名】

図面

【図 1】

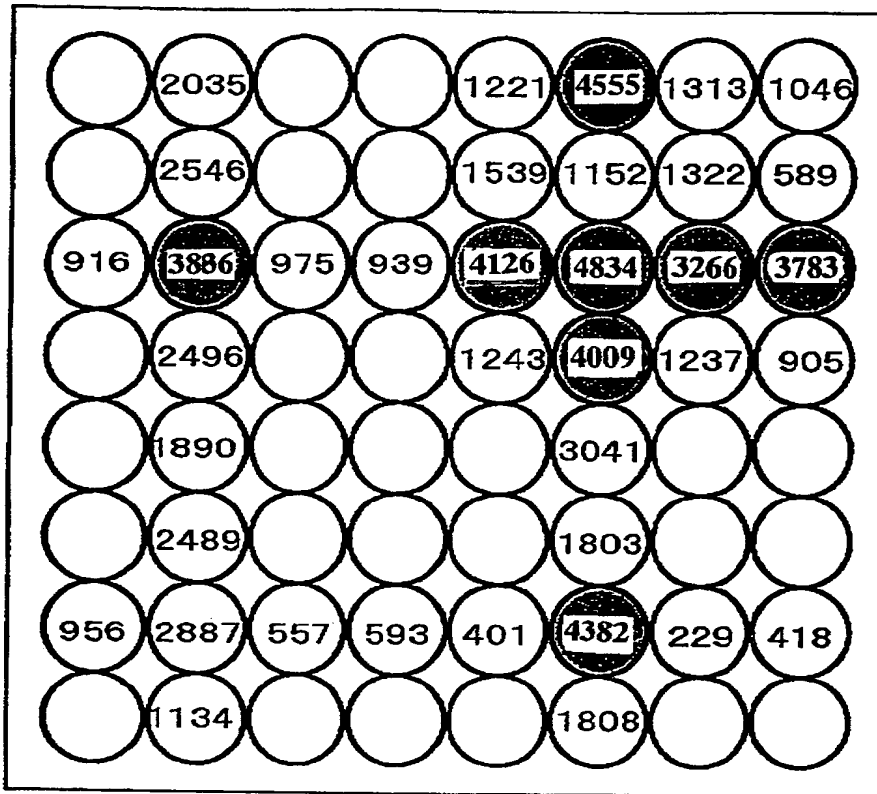


【図2】



特 2 0 0 0 - 2 6 3 3 9 6

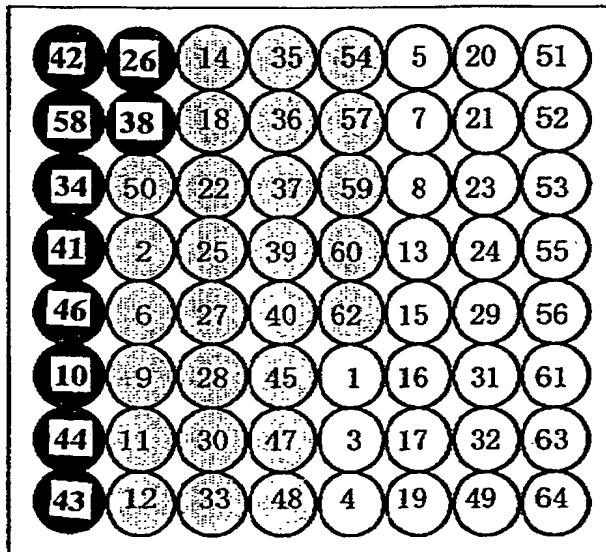
【図 3】



【図4】

正常遺伝子

Gr. No. 1 2 3 4 5 6 7 8

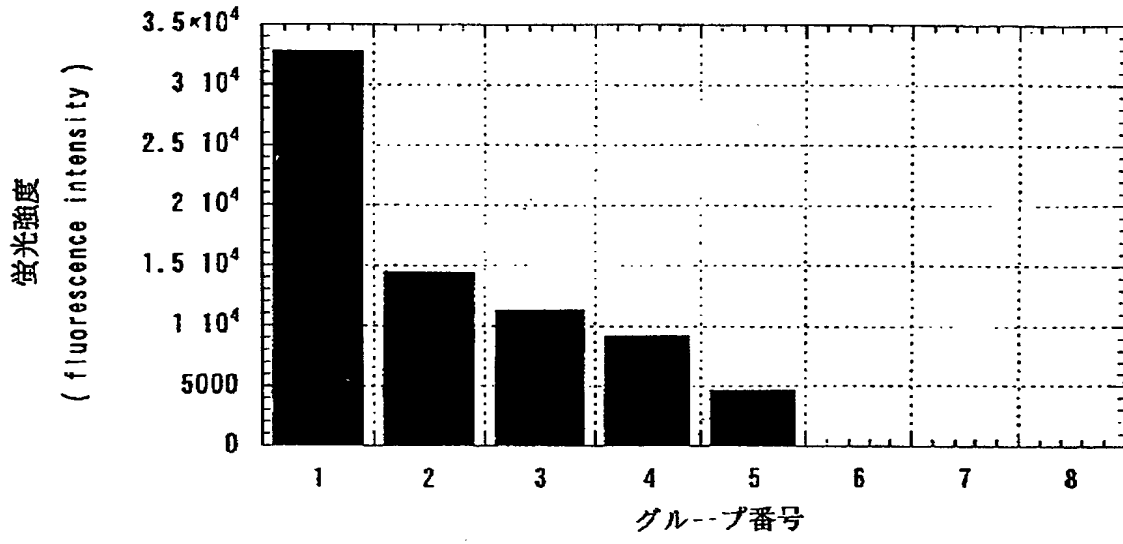


強

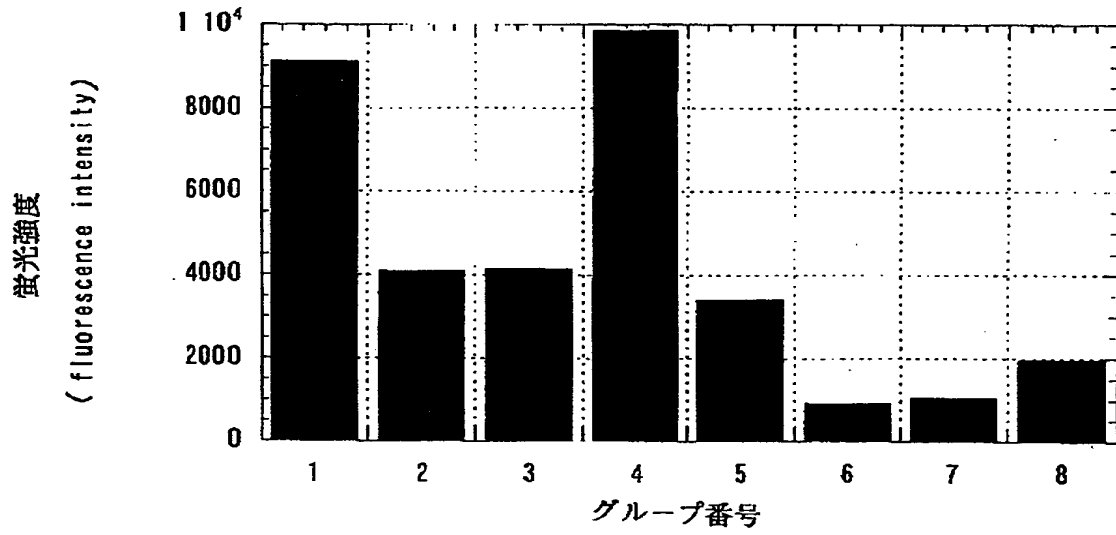
弱

- 完全マッチ
1塩基ミスマッチ
- ◐ 2塩基ミスマッチ
- 3塩基ミスマッチ

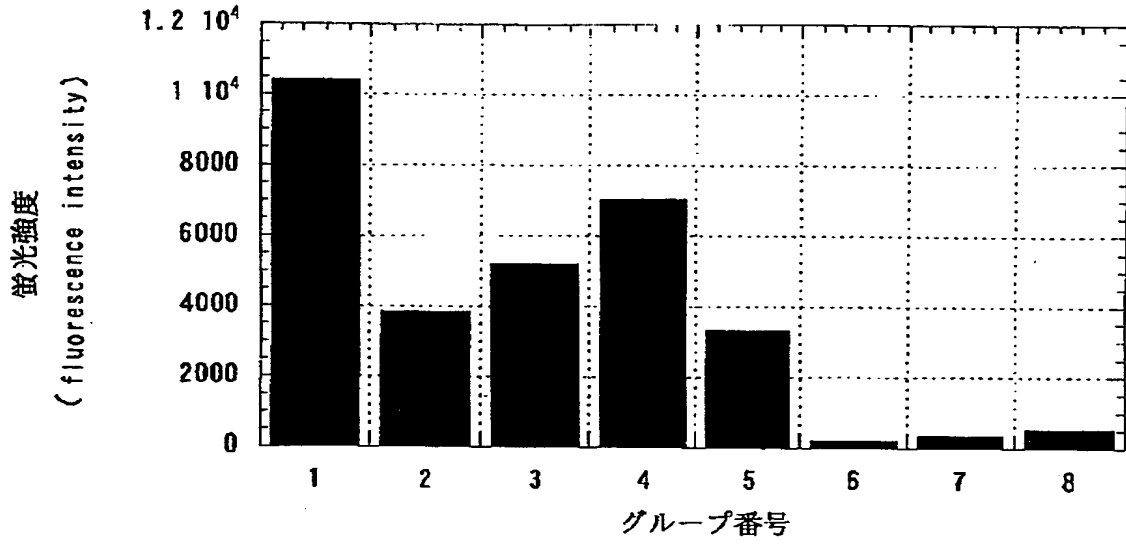
【図 5】



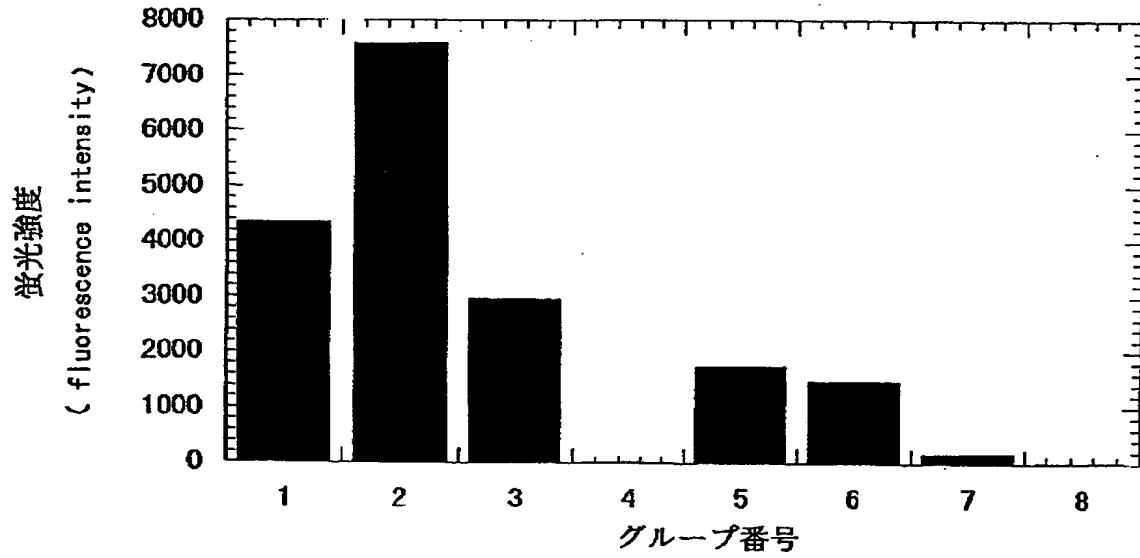
【図6】



【図7】







【図8】



【図9】

Gr.No.1		Gr.No.5	
Gr.No.2		Gr.No.6	
Gr.No.3		Gr.No.7	
Gr.No.4		Gr.No.8	

-  完全マッチ
 1塩基ミスマッチ
-  2塩基ミスマッチ
-  3塩基ミスマッチ

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高価な装置及び複雑な解析を必要とせず、遺伝子の変異の有無のみを迅速に決定するマススクリーニングに適した方法を提供すること。

【解決手段】 以下の工程：

検体核酸の被部検出部に対し完全に相補的である完全対合プローブと、該被検出部に対して不対合な塩基を少なくともひとつ備える複数種の不対合プローブとを含む複数種のプローブを、DNAアレイ基板上の所定の複数の区分領域中に分配配置して固定する工程と、

該DNAアレイ基板上のプローブと、前記検体の核酸とを、ハイブリダイゼーション用の反応系内で反応させる工程と、

前記プローブのいずれかと前記検体の核酸とのハイブリッド体の形成に基づくシグナルを、前記複数の区分領域ごとの全シグナルとして測定する工程と、

前記複数の区分領域ごとの全シグナルの変化のパターンから前記検体の核酸中の変異を判定する工程

とを有する方法により検体核酸における変異の可能性の判定を行なう。

【選択図】 図 1

出願人履歴情報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日
[変更理由] 新規登録
住所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
氏名 キヤノン株式会社